

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-290073

(43)Date of publication of application : 26.10.1999

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
A61K 47/42
A61K 48/00
C07K 9/00
C07K 14/00

(21)Application number : 10-122851

(71)Applicant : AJINOMOTO CO INC

(22)Date of filing : 16.04.1998

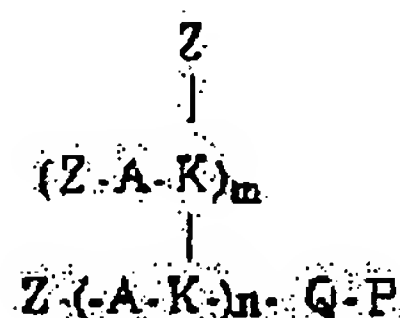
(72)Inventor : NIITOME TAKURO
AOYANAGI HARUHIKO

(54) SACCHARIDE-MODIFIED PEPTIDE DERIVATIVE CAPABLE OF TRANSFERRING GENE SPECIFICALLY INTO HEPATOCYTE, ITS PRODUCTION AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING THE SAME

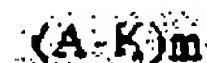
(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new derivative capable of transferring a gene specifically into hepatocytes and useful as e.g. a gene therapeutic agent for hepatic disorders in combination with a DNA, by modifying an amphiphilic α -helix peptide having gene-transferring capability with galactose group(s).

SOLUTION: This new saccharide-modified peptide derivative is such one as to be expressed by e.g. formula I [P is an amphiphilic α -helix peptide group; Q is a direct bond-forming group or a bond-forming group expressed by the formula: $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_f\text{CH}_2\text{CO}$ [(f) is 1-10]; K is a lysine residue; A is a direct bond-forming group, bond-forming group expressed by the formula: $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_o\text{hCH}_2\text{CO}$ [(h) is 1-10] or the formula $\text{NH}(\text{CH}_2)_j\text{CO}$ [(j) is 1-6;] (m) is 0-3; (n) is 1-3; Z is a group having galactose group (s)] and to be capable of transferring a gene and to consist of α -helix peptide modified with galactose group(s) and to be useful as e.g. a therapeutic agent for hepatic disorders. This derivative is obtained by reductive amination of e.g. a peptide expressed by formula II with lactose to introduce at least one galactose group into the peptide.



I



II



BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-290073

(43)公開日 平成11年(1999)10月26日

(51)IntCl.

識別記号

FI

C12N 15/09

A61K 47/42

48/00

C07K 9/00

14/00

ACS

ZNA

C12N 15/00

A61K 47/42

48/00

C07K 9/00

14/00

A

Z

ACS

ZNA

審査請求 未請求 請求項の数11 FD (全7頁)

(21)出願番号

特願平10-122851

(71)出願人 000000066

味の素株式会社

東京都中央区京橋1丁目15番1号

(22)出願日

平成10年(1998)4月16日

(72)発明者 新留 琢郎

長崎県長崎市田中町384-1-1-42

特許法第30条第1項適用申請有り 平成9年11月1日～
11月2日 社団法人日本化学会主催の「日本化学会九州
支部・同中国四国支部合同大会」において文書をもって
発表

(72)発明者 青柳 東彦

長崎県西彼杵郡長与町三根郷53-130-8
-42

(74)代理人 弁理士 石田 康昌 (外1名)

(54)【発明の名称】 肝細胞特異的に遺伝子導入可能な糖修飾ペプチド誘導体、その製造法及びそれを含む医薬組成物

(57)【要約】 (修正有)

【課題】細胞への遺伝子導入能を持つ両親媒性のヘリックスペプチドを利用して遺伝病患者の肝臓への正常遺伝子導入やアンチセンス効果による遺伝子発現制御を行うための遺伝子導入用キャリアー、及びこれを遺伝子DNA又はアンチセンスDNAと共に含有する肝臓の疾患治療剤を提供する。

【解決手段】ペプチド合成により両親媒性のヘリックスペプチドの末端に分枝型に骨格を有するペプチドユニットを調製し、還元アミノ化によりガラクトース残基を分枝鎖末端アミノ基に導入することにより得られる糖修飾ペプチド誘導体が、リジン残基の数でガラクトースの個数を規定する肝細胞特異的な遺伝子導入用キャリアーとして使用し、これを遺伝子DNA又はアンチセンスDNAと共に、静電的に結合した形で肝細胞にとり込ませることにより肝臓特異的な遺伝子医薬品組成物を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 遺伝子導入能を有する両親媒性の α ヘリックスペプチドが、ガラクトース基で修飾された肝細胞特異的に遺伝子導入可能な糖修飾ペプチド誘導体、

【請求項2】 肝細胞表面に特異的に存在するアシアロ糖蛋白質レセプターに対する認識能を有し、リジンの分岐型リガンドを結合した請求項1記載の誘導体、

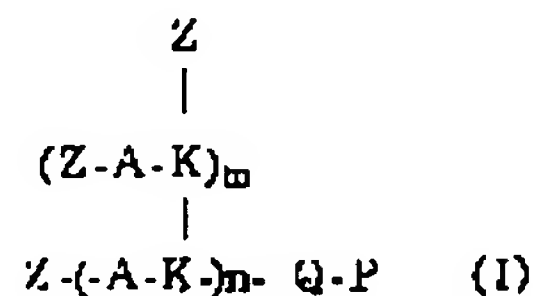
【請求項3】 ガラクトース基がリジン分岐型リガンドのアミノ基の全て又は一部を修飾する請求項2記載の誘導体、

【請求項4】 肝細胞特異的遺伝子導入用ベクターである請求項1記載の誘導体、

【請求項5】 α ヘリックスペプチドがCDスペクトルを使用した測定による α ヘリックス含量が少なくとも40%であり、ヘリックス構造モデリングにより片面に疎水性アミノ酸が、片面にリジン又はアルギニンから成る親水性アミノ酸の残基が局在することにより両親媒性を示す、全アミノ酸12〜36残基から構成され、ガラクトース基がラクトース由来の基である請求項1記載の誘導体、

【請求項6】 下記一般式(I)で示される糖修飾ペプチド誘導体を含む請求項1記載の誘導体、

【化1】



上記式中、Pは両親媒性 α ヘリックスペプチド基を表し、Qは直接結合手又は式： $-NH-(CH_2CH_2O)_j-CH_2COO-$ で示される結合手を表し、Kはリジン残基を表し、Aは直接結合手、式： $-NH-(CH_2CH_2O)_i-CH_2COO-$ で示される結合手及び式： $-NH-(CH_2)_5-CO-$ で示される結合手の何れかを表し、それぞれ、mは0乃至3、nは1乃至3、iは1乃至10、hは1乃至10、jは1乃至6の、0又は整数を表す。尚、nが1以上の整数を表す場合、記号mは複数存在するが、当該複数の記号mは全て相互に独立して整数又は0を表す。Zはガラクトース基を含む基を表し、複数存在する記号Zは、全て相互に異なる構造を有していてもよく、又複数結合するZ基の一部は脱離していてもよい。

【請求項7】 Aがアラニン残基を表す請求項6記載の誘導体、

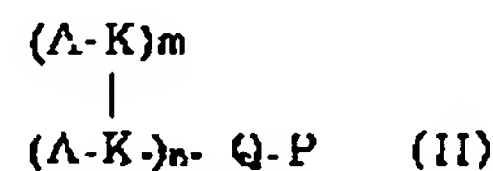
【請求項8】 当該式中、Qが示す式中の「j」が1である請求項6記載の誘導体、

【請求項9】 当該式中、PがN末端から式： $-WARI-LARI-LARI-LARI-LARI-LARI-NH_2$ で示されるペプチド残基を表す請求項6記載の誘導体。但し、上記式中、Wはトリプトファン残基を、Aはアラニン残基を、Rはアルギニン残基を及びLはリシン残基を、それぞれ表す。

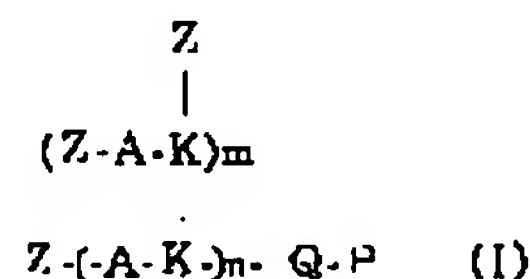
【請求項10】 請求項1乃至9記載の誘導体を含むベクターと遺伝子DNA又はアンチセンスDNAとを含有することを特徴とする肝細胞特異的遺伝子医薬品組成物、

【請求項11】 下記一般式(II)で示されるペプチド又は当該ペプチドにおいて一部アミノ基がガラクトース基で修飾されたペプチドと、ラクトースとを、還元アミノ化法により反応させて少なくとも1個のガラクトース基を導入することを特徴とする下記一般式(I)で示される糖修飾ペプチド誘導体の製造法、

【化2】



【化3】



上記式中、Pは両親媒性 α ヘリックスペプチド基を表し、Qは直接結合手又は式： $-NH-(CH_2CH_2O)_j-CH_2COO-$ で示される結合手を表し、Kはリジン残基を表し、Aは直接結合手、式： $-NH-(CH_2CH_2O)_i-CH_2COO-$ で示される結合手及び式： $-NH-(CH_2)_5-CO-$ で示される結合手の何れかを表し、それぞれ、mは0乃至3、nは1乃至3、iは1乃至10、hは1乃至10、jは1乃至6の、0又は整数を表す。尚、nが1以上の整数を表す場合、記号mは複数存在するが、当該複数の記号mは全て相互に独立して整数又は0を表し、Zはガラクトース基を含む基を表す。複数存在する記号Zは、全て相互に異なる構造を有していてもよく、又複数結合するZ基の一部は脱離していてもよい。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、肝細胞特異的遺伝子導入可能な新規糖修飾ペプチド誘導体、詳しくは遺伝子導入能を持つ両親媒性 α -ヘリックスペプチドと、肝細胞表面特異的に発現しているアシアロ糖蛋白質レセプター(ASGR)に対する認識能を持つようにガラクトース基を末端に導入した分岐型リジンとがアミド結合を形成してなる糖修飾ペプチド誘導体、その製造法及び当該糖修飾ペプチド誘導体を含む医薬組成物に関する。

【0002】 本発明の糖修飾ペプチド誘導体は、ペプチド合成技術を用いて骨格構造、特にガラクトース基導入部分を簡易に調製でき、両親媒性の α -ヘリックスペプチド部分が遺伝子導入能を持ち、分岐型糖鎖がASGRの認識能を持つことから、肝細胞に特異的な遺伝子の導入が可能であり、アンチセンス医薬、遺伝子治療等の有効成分として有用である。

【0005】

【従来の技術】近年、遺伝子治療、アンチセンスDNAによる医薬品開発が注目を集め、DNAを標的細胞に効率よく輸送するキャリアー分子の開発が盛んに行われている。現在、遺伝子治療への応用を目的とした遺伝子導入法の多くはウイルスベクターを利用したものであるが、ウイルス本体の安全面での問題を考慮した、非ウイルスベクターの研究も進んでいる。

【0006】非ウイルスベクターとしては、カチオン性リポソーム法が最も盛んに行われているが、特定細胞にターゲティングが行なうのが困難な点や細胞内に取り込まれた遺伝子の核への輸送効率等の課題を残している。このような観点から細胞表面に特異的に発現している受容体に特異的なリガンドとの結合を利用することによる特定細胞への遺伝子導入が検討された。この受容体介在型遺伝子導入法はリガンドとDNAとの複合体を生成し、リガンドに特異的な受容体を持つ細胞へ遺伝子導入を行うものである。

【0007】中でも、血清糖蛋白質の肝臓への取り込みを担っており、肝細胞に特異的に発現しているアシアロ糖蛋白質受容体(ASGR)は、認識可能なリガンド構造やその結合能との関係が分かっていることから遺伝子導入の標的として注目されてきた。例えば、他等はポリリジンを架橋剤として天然糖鎖型リガンドを持つアシアロ糖蛋白質受容体(ASGR)-クワラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子複合体を調製し、インビボ(in vivo)での遺伝子導入を行い、肝細胞への特異的な発現を確認している(Ku, C.H. et al., J. Biol. Chem., 263, 14621-14624(1988); Ku, C.H. et al., J. Biol. Chem., 264, 16985-16987(1989)参照。)、Mampre et al等は血清糖蛋白質であるFetuinから単離した天然糖鎖とポリリジンとを化学合成により結合させたより低分子量のキャリアーを用い、培養肝癌細胞への遺伝子導入を行った(Mampre et al., Bioconjugate Chem., 6, 283-291(1995)参照。)。

【0008】一方、PlankやMerwin等は分枝型リジン或いはTris(hydroxymethyl)amino-methaneを用いてラクトース又はN-アセチルガラクトサミンを末端に結合させた人工リガンドを合成し、ポリリジンとポリリジンとから成る、更に単純な構造を持つキャリアーによるASGRを介した培養細胞への遺伝子導入を行った(Plank C. et al., Bioconjugate chem., 3(6) 533-539(1992); Merwin JR. et al., Bioconjugate chem., 5(6) 612-620(1994)参照。)。

【0009】しかし、これ等の方法では何れも導入遺伝子がASGRを発現している細胞内でのDNA分解によって急速に標的細胞組織から消失して、導入遺伝子発現期間が短い、或いは発現効率が低くなっている。

【0010】これは細胞内にエンドサイトーシスによって取り込まれた導入遺伝子がエンドソームとライソソーム

の融合により分解されるためであると考えられる。即ち、細胞内へ導入されたDNAとポリリジンとの凝集体はDNAがむき出しになっているため、細胞内又はインビボ(in vivo)においてDNaseにより容易に分解されるためである。又、ポリリジンは分子量分布を持つ構造不均一な化合物であるため、医薬品の実際の開発への利用には困難が伴う。

【0011】本発明者等は、このような問題点を解決するためポリリジンに代わり遺伝子と静電的結合が可能で、かつ細胞内への遺伝子導入能を併せ持つ両親媒性 α -ヘリックスペプチドの利用を試みた(Vidome T. et al., J. Biol. Chem., 272, 24, 15307-15312 (1997)参照。)。この α -ヘリックスペプチドは親水性領域のArgによるプラスチャージによりDNAと結合し、もう一方の疎水性領域同士の相互作用により凝集体を形成する。このような安定な凝集体形成能と疎水性領域によるリン脂質膜破壊活性を有することにより、本ペプチドはポリリジンに比べ細胞への遺伝子導入能が優れていることが予想された。実際、導入能が最も高い24種類のアミノ酸残基から成る4₀-ペプチドの遺伝子導入能は、ポリリジンのそれと比較して約30倍高かった(Vidome, T. et al., J. Biol. Chem., 272, 24, 15307-15312(1997)参照。)。

【0012】そこで本発明者等は遺伝子導入能を有する新しい両親媒性 α -ヘリックスペプチドに、特定細胞においてのみ発現している受容体に対するリガンドを導入することにより、特定細胞のみへの遺伝子導入が期待できることに注目した。このような α -ヘリックスペプチドについては本発明者等の他にWyman等も遺伝子導入能を有することを示しているものの(Wyman, T. et al., Biochemistry 36, 3008-3017 (1997)参照。)、受容体に対するリガンド導入による効果に関する知見はこれまで全く知られていない。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、細胞への遺伝子導入能を持つ両親媒性 α -ヘリックスペプチドを利用して該ペプチドの末端にASGRに対するリガンドを導入したキャリアーと遺伝子又はアンチセンスオリゴヌクレオチドとから調製した凝集体を肝細胞特異的に取り込ませ、遺伝病患者への肝臓への正常遺伝子導入や肝臓でのアンチセンス効果による遺伝子発現制御を行うための、肝細胞特異的遺伝子導入用キャリアーの開発及びそれと遺伝子DNA又はアンチセンスDNAとを含有して当該DNA等を肝臓の疾患治療剤となる薬剤を提供することにある。

【0014】

【課題を解決するための手段】本発明者等はペプチド合成により両親媒性 α -ヘリックスペプチドの末端に分枝型リジン(Lys)骨格を有するペプチドユニットを調製し、ラクトースと核ペプチドユニットとを還元アミノ化

により反応させてガラクトース基を分枝鎖末端アミノ基に導入することにより、リジン残基の数でガラクトースの個数を規定する遺伝子導入用キャリアーを簡便に調製し得ることを見出した。

【0013】更に、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼをコードしたプラスミドDNAを用いて糖修飾ペプチドと複合体を形成させることにより、培養肝癌細胞 Huh-7へのASGRを介した遺伝子導入が可能であるとの知見を得た。又、その導入効率はガラクトース基の修飾個数に依存しながら高くなるとの知見を得た。本発明者等はかかる上記知見に基づいて本発明を完成するに至った。

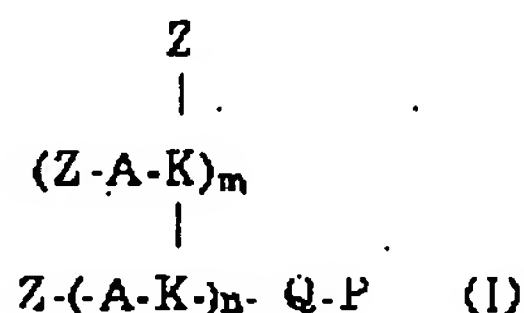
【0014】更に、本発明の目的は両親媒性 α ヘリックスペプチドに導入するガラクトース基の個数を自由に調節しうる、簡便な肝細胞特異的遺伝子導入用キャリアーの製造法を提供することにある。即ち、本発明は遺伝子導入能を有する両親媒性の α ヘリックスペプチドと、肝細胞表面に特異的に発現しているアシアロ糖蛋白質レセプター(ASGR)に対する認識能を有するガラクトース(Gal)基で修飾されたリジンの分岐型リガンドから成る肝細胞特異的遺伝子導入用ベクターに使用可能な糖修飾ペプチド誘導体、その製造法及び当該糖修飾ペプチド誘導体を遺伝子DNA又はアンチセンスDNAと共に、好ましくは両者静電的に結合した形で、含有する肝細胞に特異的な遺伝子医薬品組成物である。尚、本発明におけるガラクトース基による修飾には、ガラクトース基自体による修飾は勿論、ガラクトース基を含む置換基による修飾も含まれる。

【0015】

【発明の実施の形態】本発明の実施の形態について説明する。本発明の糖修飾ペプチド誘導体は、肝臓特異的遺伝子導入用ベクターに使用可能であり、好ましくは下記一般式(1)で示される糖修飾ペプチドを含む。

【0016】

【化1】



【0017】上記式中、Pは両親媒性 α ヘリックスペプチド基を表し、Qは直接結合手、即ち当該ペプチド基にリジン残基Kが直接結合すること、又は式： $NH-(CH_2(CH_2O))_j-CH_2CO-$ で示される結合手を表し、Kはリジン残基を表し、Aは直接結合手(ガラクトースを含む基とリジン残基との直接結合を表す)、式： $NH-(CH_2(CH_2O))_j-CH_2CO-$ で示される結合手及び式： $NH-(CH_2(CH_2O))_j-CH_2CO-$ で示される結合手の何れかを表し、それぞれ、mは0乃至3、nは1乃至3、rは1乃至10、hは1乃至10、jは1乃至6の、0又は整数を表す。

尚、nが1以上の整数を表す場合、記号mは複数存在するが、当該複数の記号mは全て相互に独立していて整数を表す。記号Zはガラクトース基を含む基を表し、複数存在する記号Zは全て相互に異なる構造を有していてもよい。又、複数結合するZ基の一部は脱離していてもよいが、多く修飾している方が好ましい。

【0018】上記化合物(1)において、Q(Qが直接結合手を表す場合は、リジン残基K)とPとは、好ましくはQ、Qが直接結合手を表す場合はリジン残基Kの、末端カルボキシル基とPのN末端アミノ基とで両者アミド結合している。又、上記化合物(1)において、Pを除いた残基は分岐鎖リガンドユニットを表し、Zは好ましくはラクトースを還元アミノ化法により残基A又はリジン残基Kの末端アミノ基に結合したガラクトース基を含む基を表し、Aは、より好ましくは β アラニンを表し、Aはリジン残基(Lys)の α 位の位置でアミド結合しており、Kは、その末端アミノ基がリジン残基Kの末端カルボキシル基とアミド結合している。

【0019】上記式中、Pは両親媒性 α ヘリックスペプチド基を、Kは分岐鎖リガンドユニットを、それぞれ表す。Pは、好ましくはCDスペクトルを用いた測定による α ヘリックス含量が少なくとも40%程度、好ましくは50%程度以上、より好ましくは70~100%程度であり、その測定値は緩衝液中での値である。ヘリックス構造モデリングにより片面に疎水性アミノ酸が、好ましくは片面にLys又はArgから成る親水性アミノ酸が局在することにより両親媒性を示す。全アミノ酸12~36残基から成る α ヘリックスペプチド基を表すことができる。

【0020】Aは、好ましくは β アラニンを表し、Qは結合基(リンカー)であり、rは、より好ましくは1の整数を表す。その末端アミノ基は、好ましくはリジン残基Kの末端カルボキシル基とアミド結合により結合している。上記結合基Qを介さないで直接結合、即ち直接アミド結合で結合することもできるが、糖の機能を十分活用するためにはスペーサーとして適当な長さの結合基を使用するのが好ましい。

【0021】当該式中、PがN末端から式： $-LARI-LARI-LARI-LRAL-LRAL-LRAL-NH_2$ (-4₂)で示される残基を表すことがより好ましい。ここで、W:トリプトファン、A:アラニン、R:アルギニン、L:ロイシンの残基である。上記ペプチドを構成するアミノ酸はD-体、L-体、DL-体何れも採用可能であるが、生体内に投与する点でL-体が好ましい。

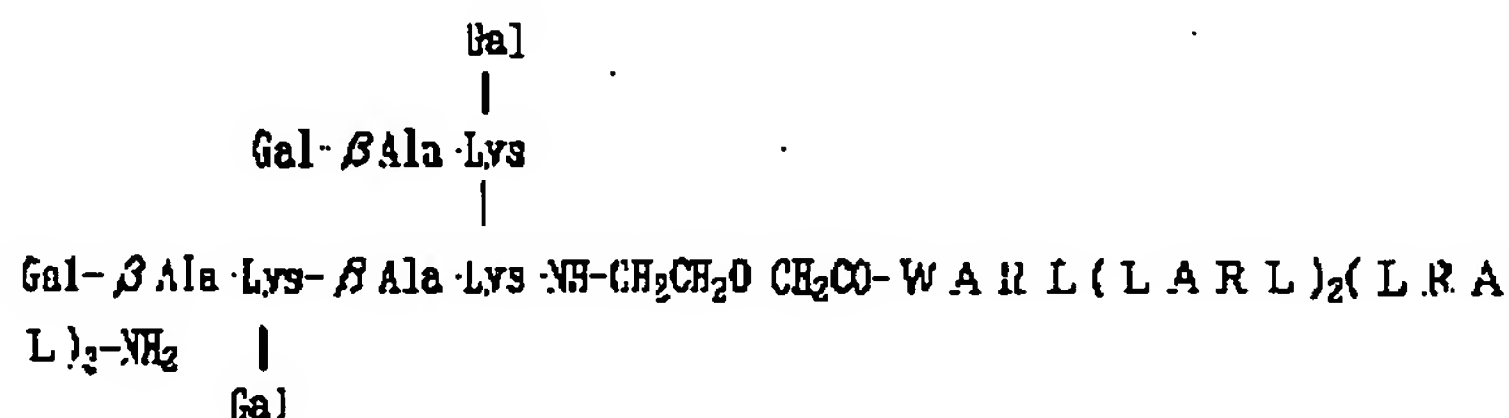
【0022】結合手Qに結合するリジン残基(一つ目)は更に、その ϵ 位のアミノ基がガラクトース基を含む基(m=0のとき)又は更に二つ目のリジン残基(m=1~3のとき)と結合することができる。当該二つ目のリジン残基は同様にその ϵ 位のアミノ基がガラクトース基を含む基(m=1のとき)又は更に三つ目のリジン残基(m=2, 3のとき)と結合することができる。

【0023】一方、一つ目（一つ目に同じ、）のリジン残基の α 位は結合手Aを介してガラクトース基を含む基（ $n=1$ のとき）又は二つ目のリジン残基（ $n=2$ 、3のとき）と結合することができる。当該二つ目のリジン残基の α 位は結合手Aを介して同様にガラクトース基を含む基（ $n=2$ のとき）又は三つ目のリジン残基（ $n=3$ のとき）と結合することができる。三つ目のリジン残基の α 位のアミノ基は、結合手A、例えばβアラニン残基等を介してガラクトース基を含む基と結合することができる。勿論、前記した通り、Z基が表すガラクトース基を含む基は全ての末端アミノ基を修飾する必要はなく、一部脱離していてもよいが、多く修飾されている方が好ましい。又、前記式中複数のZの記号が存在するが、ガラクトース基を含んでおればよく、全てのZ基において同一の構造を有する置換基を表す必要はない。

【0024】又、二つ目のリジン残基の ϵ 位アミノ基は、上記一つ目のリジン残基の ϵ 位のアミノ基に対する結合と同様であり、その ϵ 位のアミノ基がガラクトース基を含む基（ $m(m')=0$ のとき）又は更に一つ目のリジン残基（ $m(m')=1\sim3$ のとき）と結合することができる。当該二つ目のリジン残基が存在する場合



【0029】



【0030】上記式中、Galはガラクトース基を含む基を表し、W、A、R及びLは、前記説明の通りである。

【0031】本発明の糖修飾ペプチド誘導体は、例えば下記のように製造することができる。下記一般式(I)で示されるペプチドとラクトースとを、還元アミノ化法により反応させて、少なくとも1個のガラクトース基を導入することにより上記一般式(I)で示される糖修飾ペプチド誘導体を製造することができる。この方法により、出発物質のペプチドのアミノ基を順次ガラクトース基を含む基で修飾することが可能である。従って、一部ガラクトース基で修飾された糖修飾ペプチド誘導体に対して、更にこの方法によりガラクトース基を導入する方法も本発明に含まれる。尚、下記式中使用されるA、K、O、P、m及びn等の記号の意味は前記化合物(I)において説明されたものと同様である。又、Z基

合は同様にその ϵ 位のアミノ基がガラクトース基を含む基（ $m(m')=1$ のとき）又は更に三つ目のリジン残基（ $m(m')=2$ 、3のとき）と結合することができる。以下同様の結合が可能である。

【0025】尚、前記式中、一つ目（一つ目と同じ、）のリジン残基の α 位に対する置換基と、nの値により、二つ目、三つ目等のリジン残基の ϵ 位に対する置換基の記号mの整数値は、相互に独立していてもよい。従って、例えば一つ目のリジン残基の ϵ 位に対する置換基のmは0、二つ目のm(m')は2、三つ目のリジン残基の ϵ 位に対する置換基のm(m')は1を表すことができ、複数の記号mは全て相互に独立しており、そのm(m, m', m'', ...)の値として全て同一の整数値又は0を表す必要はない。

【0026】以上のような結合様式を基に、規則的にアミノ基が分岐したデンドリマーの様な規則性を有する結合の誘導体を取得できるので、より好ましい。

【0027】次に、本発明の代表的な糖修飾糖修飾ペプチド誘導体を具体的に示す：

【0028】

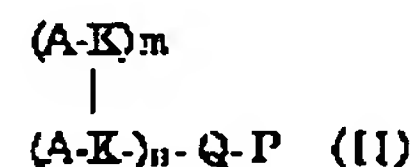
【化5】

【化6】

で全て又は多くの末端アミノ基を修飾する方が望ましいが、一部のアミノ基が未修飾である誘導体を製造してもよい。

【0032】

【化7】



【0033】還元アミノ化法に使用する還元剤としては、シアノ水素化ホウ素ナトリウム（ NaBH_3CN ）等を使用するとよい。途中、生成するシッフ塩基が還元されてガラクトース基が導入される。上記製造法によれば一般的に糖鎖合成に使用されるような保護基を導入したガラクトースを使用することなく、ラクトースを出発原料として、副反応が少なく、簡便に製造することがで

きる、反多少時間を要するが、製造コストは低いので極めて工業的方法と考えられる。

【0034】本発明の糖修飾ヘプチド誘導体を肝臓用の医薬組成物として使用するためには、この糖修飾ヘプチド誘導体と遺伝子DNA又はアンチセンスDNAと共に、好ましくは両者静電的に結合した形で、含有すると肝臓に特異的な遺伝子医薬品組成物を製造することができる。遺伝子DNAとしては、遺伝子変異が起こる疾患、例えば家族性高コレステロール血症に対する正常のLDLレセプター遺伝子、肝臓癌に対する正常の癌抑制遺伝子等が挙げられる。又、アンチセンスDNAとしては、抗ウイルス作用を示すもの、具体的にはB型及びC型肝炎ウイルスの表面抗原に対するもの、及びエンペローブ蛋白質に対するもの等が挙げられる。又、癌遺伝子の発現を抑制するもの等も挙げられる。医薬の製剤を調製するには、従来この分野での各種の製剤製造技術を最大限利用することができる。

【0035】

【実施例】以下、実施例により本発明を詳細に説明する、実施例において用いられる原料、試験法等は下記の通りである。

【0036】(1) ヘプチド合成用アミノ酸誘導体、脱保護およびカップリング試薬：p-alkoxybenzyl alcohol 樹脂、Fmoc-Ala-IH、Fmoc-Arg(Mtr)-OH、Fmoc-Leu-OH、piperidine、HBTU (2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate)、HOBt (1-hydroxybenzotriazole) (以上、何れも渡辺化学工業製市販品)

【0037】(2) その他合成用原料、試薬： $\text{NO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-IH}$ 及び重クロム酸ピリジニウム（東京化成製市販品）

(3) ピッカジンコントロールベクター（プラスミドDNA）：東洋インキ製市販品を使用。

(4) HuH-7 細胞（JCRB0103）：ヒューマンサイエンス研究資源バンクから分譲

【0038】(5) ルシフェラーゼ活性の測定方法：ピッカジンルミネッセンスキットに準じる。東洋インキから市販されている、ルミノメーターはMultiblolumat 109505を使用した（Berthold社販売品）。

(6) 細胞抽出液中の蛋白質の定量：バイオラッド社フリンテインアッセイキット（バイオラッド社製市販品）を使用。

(7) 細胞毒性評価法：Alamar blue細胞毒性評価キット：岩崎硝子社製市販品。

【0039】（実施例1）糖修飾4₂の合成

(1) ペプチド鎖の合成：ペプチド鎖はp-alkoxybenzyl alcohol樹脂を担体としてFmoc固相法により順次アミノ酸を伸長させた。

【0040】(2) リンカー誘導体（Fmoc-NH-CH₂-CH₂-H-CH₂CH₂-OH）の合成： $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-IH}$ に等量のF-

moc-O-Succinimideをジメトキシエタン/水（1/1）中で反応させ、Fmoc-NH-CH₂-CH₂-H-CH₂CH₂-OHを得た。更に、この生成物を3.5等量の重クロム酸ピリジニウムで6〜7時間酸化し、Fmoc-NH-CH₂-CH₂-O-CH₂COOHを得た。シリカゲルカラムを用いて精製し、ペプチドの合成に使用した。

【0041】(3) ペプチドのアミノ末端へのリンカーの導入：さらに修飾糖が細胞表面に存在するレセプターに認識されるように、分岐鎖導入の前にエチレングリコール骨格を有するリンカー（NH-CH₂-CO₂-O-CH₂CH₂-OH）を導入した。(1)で樹脂上に伸長したペプチド鎖のアミノ末端にFmoc-NH-CH₂-CH₂-O-CH₂COOHをHBTU、HOBtを用いてカップリングした。

【0042】(4) 枝分かれ構造の導入：リンカーの導入後、ピペリジンでFmoc基を除去し、Fmoc-bAla-Lys(Fmoc)-OHをリンカーのアミノ基にカップリングさせ枝分かれ構造を形成させた。糖2個修飾ペプチドの場合はアミノ末端をFmoc-bAla-Lys(Fmoc)-とした。糖3個修飾ペプチドの場合はFmoc-bAla-Lys(Fmoc)-Lys(Fmoc)-とし、糖4個修飾ペプチドの場合はFmoc-bAla-Lys(Fmoc)-OHを続けて2回縮合させ、Fmoc-bAla-Lys(Fmoc)-bAla-Lys(Fmoc)-bAla-Lys(Fmoc)-とした。

【0043】(5) 脱樹脂、脱保護および精製：ピペリジンでFmoc基を除去後、トリフルオロ酢酸77%、m-クレゾール2%、エタンジチオール7%、チオアニソール14%中で1時間室温で攪拌し、更に樹脂をろ過により除去後、終濃度2Mになるようにトリメチルシリルブタミドをろ液に添加し、0℃で、1時間攪拌する。減圧縮合後エーテルを添加することにより、粗ペプチドを沈殿として得た。精製は逆相HPLCにより行った。

【0044】(6) ガラクトース修飾：精製したペプチドのアミノ基に対して12等量のラクトースを添加し、37℃においてインキュベーションを行った。12時間毎に、NaBH₃CNを1等量づつ5回反応液中に添加し、ペプチドのアミンとラクトース還元末端の間に生じるシッフ塩基を還元し、ラクトースの還元アミノ化を達成した。反応は何れのペプチドにおいても60時間程度で終結した。このようにして得られた各糖修飾ペプチド誘導体はMALDI-TOF-MSによりその分子量を確認し、同定した。

【0045】（実施例2）糖修飾ペプチド誘導体とプラスミドDNAの結合能評価

糖修飾ペプチド誘導体とプラスミドDNAが複合体を形成すればその分子量は増大し、又核酸の電荷が中和されることによって、電気泳動においてその移動度が変化することはである。そこで、100ngのプラスミドDNA（ピッカジンコントロールベクター）に対して糖修飾ペプチド誘導体を核酸の負電荷に対してチャージ比が0、0.1、0.25、0.5、1、2、4、8になるようにHES中で混合する。室温で15分放置後、1%アガロース電気泳動を行い、エチジウムブromideを用いて核酸を染色後、プラスミドDNAの

移動度を評価した。

【0046】評価の結果、糖修飾ペプチド誘導体の核酸結合能は2つの糖で修飾しても、殆どその結合能には影響は認められなかったが、3個及び4個の糖で修飾した糖修飾ペプチド誘導体は、全く修飾していないペプチドに比べ若干強い核酸結合能を持つことが分かった。

【0047】(実施例3)糖修飾ペプチドとプラスミドDNAの複合体形成

糖修飾ペプチド誘導体-DNA複合体は、各糖修飾ペプチド誘導体に含まれるアルギニン残基の正電荷に対し、プラスミドDNAに含まれるリン酸基の負電荷をチャージ比が2.0となるようにHES緩衝液(21mM HEPES-KOH緩衝液、135mM NaCl、5.0mM KCl、0.76mM Na_2HPO_4 、pH7.4)中で調製した。具体的には、HES緩衝液に溶解させたプラスミドDNA(0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ を5 μl)を分取し、調製液の総量が250 μl となるように96.3 μl の滅菌水、122.5 μl の2倍濃度HES緩衝液、26.2 μl の100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 糖修飾ペプチド誘導体溶液の順に混合した。このとき、プラスミドDNAの総量は2.5 μg 、ペプチド終濃度は10.5 μM であった。その後、室温で約30分間放置し糖修飾ペプチド誘導体-DNA複合体を形成させた。

【0048】(実施例4)培養細胞Hep-2への遺伝子導入方法

5%ウシ胎児血清含有RPMI培地(1ml)を添加した24穴培養シャーレに1/10⁶個のHep-2細胞を加え、5%CO₂雰囲気下、37℃で細胞培養を48時間行った。培地を除去し、5%ウシ胎児血清なしのRPMI培地250 μl を加え、30分インキュベーション後、実施例3で調製した糖修飾ペプチド誘導体-DNA溶液を細胞に追加した。37℃で3時間インキュベーション後、1mlの5%ウシ胎児血清含有RPMI培地を追加した。その後、24時間インキュベーションし、更に、新しい1mlの5%ウシ胎児血清含有RPMI培地に入れ替え、24時間インキュベーションした。

【0049】(実施例5)導入されたプラスミドDNAからのルシフェラーゼの活性発現評価

シャーレ内の細胞集め、ピッカジーナルミネッセンス測定キット(東洋インキ)に従い、細胞内で発現しているルシフェラーゼを定量した。その結果、糖修飾ペプチドを用いた場合、修飾していないペプチドに比べ20倍から300倍のルシフェラーゼ発現を認め、糖修飾により導入効率が大きく上昇したことが認められた。又、その発現効率は修飾する糖の個数に依存し、3つ及び4つの糖で修飾したときに最大のルシフェラーゼ発現が認められた。更に、このときの発現効率はリポフェクチンを用いた場合と比較して、同等若しくは若干低いものであった。本糖修飾ペプチドは市販の遺伝子導入試薬と比較し

て発色の高い導入効率を有していることが分かった。

【0050】更に、この糖修飾ペプチドが肝細胞表面のアシアログリコプロテインレセプターに本当に認識されて、細胞内に取り込まれているのかを確認するため、アシアロフェクチン及びフェクチン存在下で、これら糖修飾ペプチド誘導体による遺伝子導入能について評価した。その結果、糖修飾ペプチドによる遺伝子導入効率はアシアロフェクチン存在下で20%から1%まで低下した。又、比較として、フェクチン存在下でルシフェラーゼ発現を評価した結果、何れのペプチドもその発現効率に大きな低下は認められなかった。以上のことから、これら糖修飾ペプチドは肝細胞表面のアシアログリコプロテインレセプターに認識されていることが示唆された。一方、糖修飾していないペプチドはアシアロフェクチン存在下でルシフェラーゼ発現には影響を受けなかった。

【0051】(実施例6)細胞毒性評価

5%ウシ胎児血清含有ダルベッコ改変イーグル培地(100 μl)を添加した96穴培養シャーレに2/10⁶個のHep-2細胞を加え、5%CO₂雰囲気下、37℃で細胞培養を15時間行った。5%ウシ胎児血清なしのDMEM培地10 μl を加え、30分インキュベーション後、前記実施例2に説明した糖修飾ペプチド誘導体-DNA溶液40 μl を細胞に添加した。37℃で3時間インキュベーション後、80 μl の5%ウシ胎児血清含有ダルベッコ改変イーグル培地を添加し、更に、3時間インキュベーションした。アラマール溶液16 μl を細胞に添加し、37℃で4時間インキュベーション後、96穴シャーレの蛍光をLabsystems Fluoroskan IIで定量し、細胞生存率を算出した。

【0052】その結果、糖修飾ペプチド誘導体-プラスミドDNA複合体添加による細胞生存率は何れの糖修飾ペプチド誘導体においても70%から70%であり、糖の修飾個数を多くするに従って、プラスミド毒性が若干大きくなる傾向が認められた。

【0053】

【発明の効果】例えば、ペプチド合成により両親媒性のヘリックスペプチドの末端に分枝型lys骨格を有するペプチドユニットを調製し、好ましくはラクトースの還元アミノ化によりガラクトース基を分枝鎖末端アミノ基に導入することにより得られる糖修飾ペプチド誘導体が、リジン残基の数でガラクトース基の個数を規定する肝細胞特異的遺伝子導入用キャリアーとして使用可能であり、これを遺伝子DNA又はアンチセンスDNAと共に、好ましくは両者静電的に結合した形で、含有する製剤により肝細胞に特異的な遺伝子医薬品組成物を提供可能とする。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.